

D7

**COMPLEX OF NUCLEIC ACID AND IMMUNOCHEMICALLY ACTIVE MATERIAL,
ITS PRODUCTION AND IMMUNOCHEMICAL MEASURING REAGENT USING
THEREOF**

Publication number: JP7118291

Publication date: 1995-05-09

Inventor: OKU YUICHI

Applicant: NISSUI PHARM CO LTD

Classification:

- **International:** G01N33/53; C07K1/113; C07K16/00; G01N33/53;
C07K1/00; C07K16/00; (IPC1-7): C07K1/113;
C07K16/00; G01N33/53

- **European:**

Application number: JP19930285700 19931021

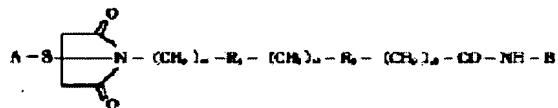
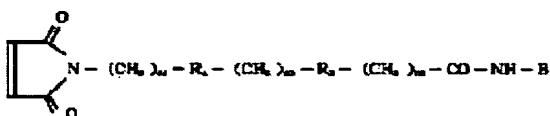
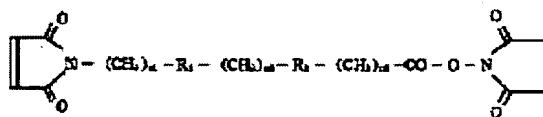
Priority number(s): JP19930285700 19931021

[Report a data error here](#)

Abstract of JP7118291

PURPOSE: To obtain, in a high yield, the complex having high activities, useful for immunochemical measurement by reacting a specific compound containing a maleimide group with a nucleic acid and further with an immunochemically active compound.

CONSTITUTION: A nucleic acid is reacted with a compound of the formula I (R1 and R2 are each single bond or 6 membered ring hydrocarbon residue; n1, n2 and n3 are each 0-15) to obtain a compound of the formula II (B is a residue when a nucleic acid is expressed by B-NH2) which is, then, reacted with an immunoactive material to obtain the complex of the formula III (A is a residue when an immunochemically active material is expressed by A-SH).



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-118291

(43) 公開日 平成7年(1995)5月9日

(51) Int.Cl.⁶
C 07 K 1/113
16/00
G 01 N 33/53

識別記号
8318-4H
8318-4H

M

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数9 FD (全17頁)

(21) 出願番号 特願平5-285700

(22) 出願日 平成5年(1993)10月21日

(71) 出願人 000226862

日水製薬株式会社

東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号

(72) 発明者 奥 裕一

茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬

株式会社診断薬研究所内

(74) 代理人 弁理士 光来出 良彦

(54) 【発明の名称】 核酸と免疫化学的活性物質との複合体、その製法およびその複合体を使用する免疫化学的測定試薬

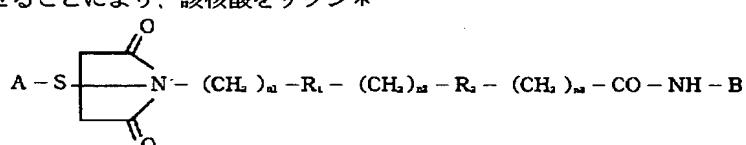
(57) 【要約】

【目的】 核酸-免疫化学的活性物質複合体の高回収率を実現し、その複合体の活性をより高く保持することを実現し、抗原抗体反応を利用した免疫化学的分析法に使用できる核酸-免疫化学的活性物質複合体を提供する。

【構成】 核酸に、サクシミド基とマレイミド基を有する2官能試薬を反応させることにより、該核酸をサクシ*

*ミド基と結合させ、次いで、得られた化合物を免疫化学的活性物質、例えば、酵素、抗体等と反応させることにより、該免疫化学的活性物質を前記化合物のマレイミド基に結合させて、下記の一般式で表される核酸と免疫化学的活性物質との複合体を得る。

【化1】



〔式中、Aは免疫化学的活性物質をA-SHで表したときのその残基を表し、B、n₁、n₂、n₃、R₁およびR₂は

それぞれ化学結合または6員環状炭化水素残基を表す。〕

1

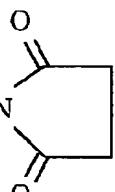
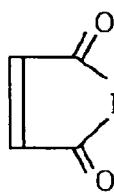
2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸に次の一般式で表される化合物

*【化1】

*

〔式中、 n_1 、 n_2 および n_3 はそれぞれ独立した0から15のあいだの整数を、 R_1 および R_2 はそれぞれ化学結合

※とにより、次の一般式で示される化合物

【化2】

または6員環状炭化水素残基を表す。】を反応させること

10

または6員環状炭化水素残基を表す。】を反応させること

※

〔式中、 n_1 、 n_2 および n_3 はそれぞれ独立した0から15のあいだの整数を、 R_1 および R_2 はそれぞれ化学結合

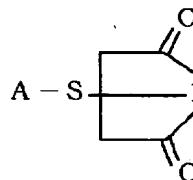
20

【化3】

または6員環状炭化水素残基を表す。】を得、

または6員環状炭化水素残基を表す。】を得、

★

〔式中、Aは免疫化学的活性物質をA-SHで表したときのその残基を表し、B、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 R_1 および R_2 はそれぞれ化学結合または6員環状炭化水素残基を表す。】を得ることを特徴とする核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項2】 前記核酸が、ポリリボヌクレオチド、ポリデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチドあるいはこれら2種以上の複合体から選ばれたものである請求項1記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項3】 前記免疫化学的活性物質が抗体である請求項1または2記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項4】 前記免疫化学的活性物質が抗原である請求項1、2または3記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項5】 前記抗体がIgGまたはその消化物である

★る請求項4記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

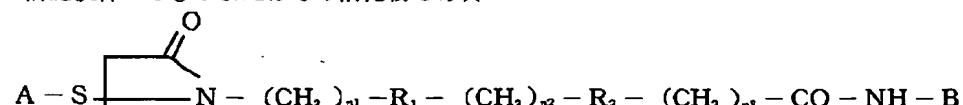
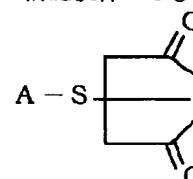
30 【請求項6】 前記IgGの消化物がFab'である請求項5記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項7】 前記核酸に含有されるアミノ基(NH₂)が、核酸の3'末端または5'末端のもの、あるいは核酸の分子中に導入されたものである請求項1、2、3、4、5または6記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

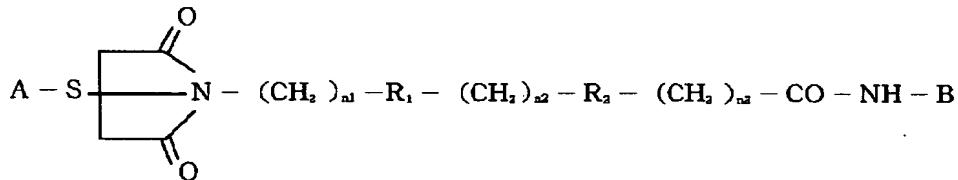
【請求項8】 請求項1、2、3、4、5、6または7記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法

40 により得られ、次の一般式で表される免疫化学的分析に使用されることを特徴とする核酸と免疫化学的活性物質との複合体。

【化4】



【請求項9】 請求項1、2、3、4、5、6または7記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法により得られ、次の一般式で表される核酸と免疫化学的*



*活性物質との複合体を含んだことを特徴とする免疫化学的測定試薬。

【化5】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫化学的分析に使用することができる核酸と免疫化学的活性物質との複合体自体、その製造方法及び核酸と免疫化学的活性物質との複合体自体を使用する免疫化学的測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床検査の分野において免疫化学的検出法は、微量の成分を定量、検出する方法として知られ、種々の方法が開発されている。その中で抗体の標識物質として、蛍光物質、発光性物質、酵素等の非放射性物質を使用する免疫化学的検出法は、標識物質として放射性物質を使用した際のように特殊な施設を必要とせず、試薬の扱いやすさ、大量処理が可能などの点から生体成分分析法で広く利用されている。また、標識物質として放射性同位元素を用いるラジオイムノアッセイもその測定レンジの広さ、免疫反応の低下が少なく、薬剤、ペプチドなどの小さな分子量の物質を標識可能であることから広く利用されている。

【0003】このような免疫化学的検出法において、標識された抗体が直接固相に結合して非特異反応を起こす、いわゆる測定のバックグラウンドの上昇が近年問題となっており、このような非特異反応を防ぐことにより、測定感度を上げようとする試みが、例えば、特開平4-204379号公報によりなされている。

【0004】(1)特開平4-204379号公報に開示の免疫化学的検出方法

図1は該公報に開示された免疫化学的検出法のプロセスを示す図であり、この図1に基づいて、該公報に記載の技術を次に説明する。1は固相であり、2は固相1に結合した核酸である。一方、核酸2と相補的な塩基配列を有する核酸3の末端には免疫化学的活性物質である抗体4が結合されており、前記核酸2と核酸3は相補的に結合することにより、抗体4を固相1に固定している。

【0005】この固相1に対して測定対象物である抗原5を含む試料を接触させ(図1(a))、抗原抗体反応により試料中に含まれている抗原5を固相1上に結合している抗体4で捕捉し(図1(b))、さらに捕捉された抗原5に対して、標識物7で標識された抗体6を結合させる。もしこの段階で標識物7を定量することにより

10 試料中の抗原5を測定する場合、標識物7で標識された別の抗体が固相1に結合してバックグラウンドを上昇させるので正確な測定が困難となる。したがって、制限酵素8を核酸部分に作用させることにより(図1(c))、核酸を選択的に切断して(図1(d))、固相1から分離された標識物7を含んだものを定量することにより、試料中に含まれる抗原5をバックグラウンドの影響が無く精度よく定量することができる。

【0006】前記公報によれば、核酸3とその末端に結合される抗体4との結合方法は、例えば、ゴッシュラの方法(Ghosh et al: Bioconjugate Chem., 1, 71~76頁(1990))のマレイミド-チオールカップリングにより結合したとされている。前記公報に引用された文献のゴッシュラの方法には、次の2つの結合方法が示されている。図2及び図3に基づいて、ゴッシュラの方法を説明する。

【0007】(2)ゴッシュラの方法

i. その一つは、図2に示される方法であり、核酸の5'末端にスルフヒドリル基を導入しておき、他方、酵素に6-マレイミドヘキサノイックアシッドスクシイミドエステルを反応させてマレイミド基を導入しておき、次に、これらの2種の化合物を反応させて前記のスルフヒドリル基とマレイミド基を結合させることにより、核酸と酵素とを結合させる方法である。

【0008】この方法によれば、添加したアルカリ性フォスファターゼの8.5%がオリゴヌクレオチドに結合したアルカリ性フォスファターゼ、即ち、核酸-酵素複合体として回収されること、及びオリゴヌクレオチドとアルカリ性フォスファターゼの結合比は1対1であり、この核酸-酵素複合体は何の処理も施していない酵素の80から85%の活性が保持されていたことが示されている。また、β-ガラクトシダーゼに関しては、その核酸-酵素複合体として回収率は6.5%、この核酸-酵素複合体は何の処理も施していない酵素の7.5%の酵素活性が保持されていたことが示されている。

【0009】ii. ゴッシュラのもう一つの方法は、図3に示される方法であり、核酸の5'末端に前記の方法と同じようにスルフヒドリル基を導入し、このスルフヒドリル基にさらにホモ二官能性試薬であるN,N'-1,2-フェニレンジマレイミドを反応させることにより、核酸の5'末端にマレイミド基を導入しておき、他